

Антивирусный препарат

Область техники

Настоящее изобретение относится к фармакологически активным веществам природного происхождения и может быть использовано для получения
5 антивирусных лекарственных средств и лечения вирусных инфекций.

Предшествующий уровень техники

Известны фармацевтические препараты, содержащие комплекс экстрактивных веществ животных или растительных тканей и применяемые для
10 лечения вирусных инфекций путем стимуляции иммунной системы и прямого воздействия на вирионы или зараженные вирусом клетки.

Известен процесс получения из CD4-позитивных Т-лимфоцитов и клеток костного мозга белков, подавляющих развитие вируса иммунодефицита человека [пат. US 5,480,782] (1).

15 Известно наружное средство, содержащее экстракт растения *Ginkgo biloba* и обладающее антивирусной и антибактериальной активностью [Пат. DE 4334600 A1] (2).

Патент WO 81/03124 [3] описывает полипептидную фракцию, выделенную из моллюска *Mytilus edulis* и активную в отношении различных вирусов, бактерий
20 и простейших.

Известны антивирусные препараты растительного происхождения, механизм действия которых основан на инактивации свободных вирусных частиц, блокировании их транспорта через клеточную мембрану или подавлении репликации вируса в клетке-хозяине [Ершов Ф.И., Антивирусные препараты,
25 Москва, изд-во Медицина, 1998] (4).

Известна многокомпонентная композиция, выделенная из тканей насекомого *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy (Diptera, Calliphoridae) и обладающая антивирусной активностью [Пат. US 6,337,093] (5). Из состава данной композиции выделен пептид аллоферон с антивирусной и противоопухолевой
30 активностью [пат. RU 2172322] (6). Антивирусная активность указанной композиции и ее действующего вещества аллоферона обусловлена иммуномодулирующими свойствами: способностью индуцировать синтез интерферона и усиливать цитотоксическую активность естественных киллеров [Chernysh et al. Antiviral and antitumor peptides from insects // PNAS, 2002, 99, p.

12628-12632] (7). В то же время ни указанная композиция, ни аллоферон не оказывают прямого защитного действия на клетки, подвергнутые вирусной инфекции.

Указанная композиция и ее действующее вещество аллоферон являются
5 единственными антивирусными препаратами из насекомых, известными в настоящее время. По этому признаку они являются наиболее близкими аналогами настоящего изобретения.

Перечисленные выше и аналогичные им фармацевтические препараты природного происхождения увеличивают арсенал антивирусных лекарственных
10 средств. Однако известные препараты не покрывают существующую потребность, в связи с чем вирусные инфекции остаются одной из наиболее опасных и трудноизлечимых групп заболеваний человека и животных.

В задачу настоящего изобретения входит расширение арсенала антивирусных лекарственных средств.

15

Раскрытие изобретения

В процессе создания настоящего изобретения установлено, что гемолимфа различных насекомых содержит экстрактивные вещества, введение которых в
20 культуру клеток млекопитающих увеличивает устойчивость последних к вирусной инфекции. Дальнейшие систематические исследования крылатых насекомых (подкласс Pterigota класса Insecta) позволили выявить наличие аналогичной антивирусной активности в отдельных таксономических группировках ранга видов, родов, семейств и отрядов. В результате была разработана методология
25 поиска антивирусных лекарственных средств, содержащихся в тканях насекомых, и определены на ее основе виды и группы более высокого ранга, наиболее перспективные в качестве источника антивирусных веществ.

Таким образом, предметом настоящего изобретения является новая группа антивирусных средств – антивирусные препараты прямого действия, получаемые
30 путем экстракции тканей насекомых, в частности представителей отрядов Odonata (стрекозы), Mantoptera (богомолы), Hemiptera (полужесткокрылые), Coleoptera (жуки), Diptera (двукрылые), Mecoptera (скоропионницы) или Lepidoptera (бабочки). Под препаратами прямого действия в данном случае понимаются индивидуальные вещества или их смеси, увеличивающие устойчивость клеток

- организма к вирусной инфекции путем разрушения вируса, блокирования его репликации или иным способом, который может осуществляться без участия иммунной системы. Отличительной особенностью и родовым признаком таких препаратов служит повышение устойчивости клеток-мишеней к вирусной атаке
- 5 вне организма (*in vitro*), например, при введении препарата в культуральную среду с клетками. Антонимом препаратов прямого действия в контексте настоящего изобретения являются иммуномодуляторы, фармакологическая активность которых основана на стимуляции антивирусного иммунного ответа организма. Понятно, что некоторые метаболиты насекомых могут сочетать свойства
- 10 антивирусного препарата прямого и иммуномодулирующего механизма действия. Последнее обстоятельство не должно препятствовать их включению в заявляемый группу лекарственных средств, если терапевтическая эффективность этих веществ полностью или частично обусловлена механизмом прямого антивирусного действия.
- 15 Понятно также, что антивирусные вещества, первоначально выделенные из тканей указанных насекомых, могут быть воспроизведены путем химического или биологического синтеза и использованы в таком или модифицированном виде в качестве лекарственных средств. Модификации базовой структуры могут преследовать цели увеличения стабильности, биодоступности, антивирусной
- 20 активности, снижения токсичности или иных побочных эффектов препарата. Полученные индивидуальные вещества и их смеси могут использоваться в составе фармацевтических композиций, а также в комбинации с другими антивирусными средствами.
- Указанную совокупность антивирусных веществ прямого действия, выделяемых из
- 25 тканей различных насекомых, использован термин «энтовирон» (автор исходил из следующей доступной в источниках информации и общепринятой при классификации биологически активных веществ терминологии: “энто-“ от греческого “энтомон” — насекомое и “-вирон” от латинского “вирус”).
- С целью изучения типового распределения энтовиронов в пределах класса
- 30 насекомых были исследованы по единой методике препараты гемолимфы 31 вида насекомых:

Отряд Mantoptera: Iris polystictica

Отряд Hemiptera: Aphrophora salicina

Отряд Coleoptera: Pseudophonus rufipes, Acanthocinuss aedilis, Nicrophorus vespillo

Отряд Hymenoptera: *Vespa crabro*, *Diprion pini*, *Athalia colibri*

Отряд Diptera: *Delia brassicae*, *Calliphora uralensis*, *Musca domestica*, *Epysyrphus balteatus*, *Stratiomys singularior*, *Gasterophilus veterinus*, *Lunaticipula sublunata*

Отряд Mecoptera: *Panorpa communis*

- 5 Отряд Lepidoptera: *Mamestra persicaria*, *Diachrysia chrysitis*, *Operophtera brumata*, *Cossus cossus*, *Dendrolimus sibiricus*, *Lasiocampa trifoli*, *Axylia putris*, *Notodonta dromedarius*, *Sphinx ligustri*, *Ephestia kuhniella*, *Tortrix viridana*

Отряд Odonata: *Aeschna cyanea*, *Aeschna grandis*, *Libellula quadrimaculata*, *Somatochlora metallica*

10

Присутствие энтовиронов установлено в образцах 26 видов, относящихся ко всем исследованным отрядам насекомых (Таблица 1). Лишь 5 образцов дали негативный результат. Исследованные отряды, как показано на Фиг. 1, относятся к двум

- 15 (древнекрылые) и Neoptera (новокрылые). На этом основании энтовироны можно считать характерной особенностью подкласса Pterigota в целом. Этот вывод подтверждается тем обстоятельством, что энтовироны обнаружены во всех подразделениях группы Neoptera, включающих Polyneoptera, Paraneoptera и Oligoneoptera, а также во всех подразделениях наиболее многочисленной группы
- 20 Oligoneoptera, а именно Neuropteroidea, Hymenopteroidea и Mecopteroidea.

Представители подкласса Apterigota в исследовании не участвовали в связи с техническими трудностями получения образцов гемолимфы. Поэтому формула настоящего изобретения ограничена представителями подкласса Pterigota.

- Хотя энтовироны широко распространены среди насекомых, активность их
- 25 существенно различается у представителей различных группировок. Наибольшей активностью отличаются энтовироны представителей отряда Odonata (стрекозы), в частности стрекоз семейства Aeschnidae, таких как *Aeschna grandis* и *Aeschna cyanea*, а также семейства Libellulidae, в частности *Libellula quadrimaculata* и *Somatochlora metallica*. Другая группа с повышенной активностью энтовиронов
- 30 относится к отряду Lepidoptera, в частности к семейству Noctuidae, представленному видами *Diachrysia chrysitis* и *Mamestra persicaria* семейства, а также семейству Geometridae на примере *Operophtera brumata*. Кроме того, высокий уровень активности энтовиронов характерен для некоторых представителей отрядов Coleoptera (*Pseudophonus rufipes*, Carabidae) и Diptera

(*Stratiomys singularior*, Stratiomyidae). Представители перечисленных выше видов, семейств и отрядов особенно полезны в качестве источника получения энтовиронов.

5 Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Пример 1. Выделение энтовиронов из гемолимфы насекомых

Исходный биологический материал для постановки опытов (личинок насекомых определенного вида и стадии развития) получали из природных популяций, определяли видовую принадлежность и содержали в лабораторных условиях при комнатной температуре и естественной влажности. Имунную систему личинок активировали путем прокола кутикулы иглой, смоченной суспензией убитых нагреванием (1 мин на кипящей водяной бане) клеток бактерий *Escherichia coli* и *Micrococcus luteus* (10^9 /мл клеток каждого вида). Иммунизированных таким образом личинок инкубировали в течение суток при комнатной температуре. По истечение этого срока поверхность личинок стерилизовали 70 %-ным этанолом, промывали личинок в стерильной дистиллированной воде и подсушивали на фильтровальной бумаге. Гемолимфу личинок собирали через разрез кутикулы в охлажденные на льду пробирки с добавлением апротинина и фенилтиомочевины для подавления протеолитической и фенолоксидазной активности гемолимфы, немедленно замораживали в жидком азоте и хранили до использования при -20°C . Размороженную гемолимфу центрифугировали 10 мин при 4000 G, супернатант подкисляли трифторуксусной кислотой до конечной концентрации кислоты 0.05 % (v/v) и наносили на колонку Sep-Pak с сорбентом C_{18} (фирма Waters) из расчета 3 мл гемолимфы на 1 г сорбента. Гидрофильные компоненты гемолимфы удаляли, промывая колонку 0.05 %-ной трифторуксусной кислотой. Затем сорбированные на колонке гидрофобные компоненты элюировали 50%-ным ацетонитрилом в 0.05 %-ной трифторуксусной кислоте. Полученную в результате элюции ацетонитрилом смесь гидрофобных компонентов лиофилизировали и использовали для определения антивирусной активности.

Пример 2. Антивирусная активность энтовиронов, выделенных из гемолимфы насекомых.

- Антивирусную активность определяли в системе *in vitro*, обычно используемой для определения антивирусной активности интерферонов [Chernysh et al. Antiviral and antitumor peptides from insects // PNAS, 2002, 99, p. 12628-12632] (7). Культуру клеток человека L 41 выращивали в лунках 96-луночных планшетов до образования монослоя клеток на дне лунки. Затем в лунку вносили тестируемый препарат и одновременно вирус везикулярного стоматита (VSV, штамм Индиана) в дозе 100 ЦПД₅₀ (цитопатическая доза, вызывающая гибель 50% клеток монослоя). В контрольные лунки вносили эквивалентное количество растворителя. Зараженную вирусом культуру инкубировали 18 часов при 37⁰С, затем клетки окрашивали 0.1% раствором красителя “кристаллический фиолетовый”. Долю погибших клеток определяли путем последующей экстракции красителя и определения его оптической плотности при 590 нм. Критерием активности энтовиронов служило увеличение доли выживших клеток монослоя по сравнению с контролем. Результат признавался положительным при уровне достоверности различий между опытом и контролем $P < 0.01$ по критерию Стьюдента.
- Результаты изучения антивирусной активности препаратов гемолимфы 31 вида насекомых представлены в Таблице 1. Образцы, давшие положительную реакцию в тесте на антивирусную активность, отмечены знаком “•”. Всего таких образцов обнаружено 26 или 84% всего массива данных. Как видно из рисунка 1, содержащие энтовироны образцы относятся к 8 отрядам, представляющим все подразделения крылатых насекомых (Pterigota): Palaeoptera и Neoptera, Polyneoptera, Paraneoptera и Oligoneoptera, Neuropteroidea, Hymenopteroidea и Mecopteroidea. На этом основании энтовироны следует считать характерным компонентом гемолимфы класса насекомых в целом.
- Среди исследованных образцов выделяются высоким уровнем активности энтовиронов четыре кластера, относящихся к определенным отрядам и семействам. Прежде всего это образцы, полученные из гемолимфы стрекоз (отряд Odonata), представленных семействами Aeschnidae и Libellulidae на примере *Aeschna grandis* и *Libellula quadrimaculata*, соответственно. Второй кластер относится к отряду жуки (Coleoptera), представленному семейством Carabidae на примере *Pseudophonus rufipes*. Третий кластер образуют препараты гемолимфы бабочек (Lepidoptera), представленные семейством Noctuidae на примере совок *Diachrysia chrysitis* и *Mamestra persicaria*, а также семейством Geometridae на примере пяденицы *Operophtera brumata*. Наконец, четвертый кластер относится к отряду

двукрылых (Diptera), представленному семейством Stratiomyidae на примере *Stratiomys singularior*.

Перечисленные виды, семейства и отряды являются особенно полезными в качестве источника получения энтовиронов.

5

Лучший вариант осуществления изобретения

Лучший вариант осуществления изобретения представлен в примере 1, описывающем методику выделения энтовиронов, и примере 2, демонстрирующем антивирусную активность различных представителей этой группы антивирусных
10 препаратов. Согласно приведенным результатам анализа, максимальной антивирусной активностью обладает энтовирон насекомого *Libellula quadrimaculata*.

Промышленная применимость

Промышленная применимость заявленного изобретения подтверждается
15 приведенными в заявке результатами исследований, которые показывают, что применение энтовиронов позволяет эффективно предупреждать гибель инфицированных вирусом клеток, что является целью антивирусной терапии. Благодаря этому свойству энтовироны могут быть использованы при лечении вирусных заболеваний. Поскольку промышленные методы получения
20 биологически активных веществ в настоящее хорошо разработаны, производство энтовиронов химическими или биологическими методами не представляет принципиальной сложности.

Таблица 1. Антивирусная активность энтовиронов, выделенных из гемолимфы
25 насекомых

Препарат	Семейство	Выживаемость инфицированных вирусом клеток, %		Наличие энтовиронов (P<0.01)
		Серия 1	Серия 2	
Контроль		8.2 ± 0.23	6.0 ± 0.27	
Отряд Odonata				
<i>Aeschna cyanea</i>	Aeschnidae		17.0± 1.0***	●
<i>Aeschna grandis</i>	Aeschnidae		38.5± 3.5***	●
<i>Libellula quadrimaculata</i>	Libellulidae	69.5± 5.5***		●
<i>Somatochlora metallica</i>	Libellulidae		15.5± 1.5***	●

Отряд Mantoptera				
<i>Iris polystictica</i>	Mantidae	13.5 ± 1.5***		•
Отряд Hemiptera				
<i>Aphrophora salicina</i>	Aphrophoridae	11.0 ± 1.0**		•
Отряд Coleoptera				
<i>Pseudophonus rufipes</i>	Carabidae	30.0 ± 3.0***		•
<i>Acanthocinuss aedilis</i>	Cerambycidae		12.0 ± 1.0***	•
<i>Nicrophorus vespillo</i>	Silphidae		9.0 ± 0.0***	•
Отряд Diptera				
<i>Delia brassicae</i>	Anthomyidae		10.0 ± 0.0***	•
<i>Calliphora uralensis</i>	Calliphoridae	9.3 ± 1.75		
<i>Musca domestica</i>	Muscidae		8.5 ± 0.5	
<i>Epysyrphus balteatus</i>	Syrphidae	17.5 ± 2.5***		•
<i>Stratiomys singularior</i>	Stratiomyidae	32.5 ± 4.5***		•
<i>Gasterophilus veterinus</i>	Gasterophilidae	11.5 ± 1.5***		•
<i>Lunatipula sublunata</i>	Tipulidae		9.5 ± 1.5**	•
Отряд Mecoptera				
<i>Panorpa communis</i>	Panorpidae	15.0 ± 2.0***		•
Отряд Hymenoptera				
<i>Vespa crabro</i>	Vespidae	10,1 ± 0.9*		
<i>Diprion pini</i>	Diprionidae		7.0 ± 1.0	
<i>Athalia colibri</i>	Tentridinidae		9.5 ± 0.5 ***	•
Отряд Lepidoptera				
<i>Mamestra persicaria</i>	Noctuidae	25.0 ± 2.0***		•
<i>Diachrysia chrysitis</i>	Noctuidae	23.5 ± 2.5***		•
<i>Operophtera brumata</i>	Geometridae	35.5 ± 3.5***		•
<i>Cossus cossus</i>	Cossidae	7.1 ± 1.4		
<i>Dendrolimus sibiricus</i>	Lasiocampidae		12.5 ± 0.5***	•
<i>Lasiocampa trifoli</i>	Lasiocampidae		9.5 ± 0.5***	•
<i>Axylia putris</i>	Noctuidae		11.5 ± 0.5***	•
<i>Notodonta dromedarius</i>	Notodontidae		9.5 ± 0.5***	•
<i>Sphinx ligustri</i>	Sphingidae		10.0 ± 1.0***	•
<i>Ephestia kuhniella</i>	Pyrallydae		10.0 ± 0.0***	•
<i>Tortrix viridana</i>	Tortricidae	12.5 ± 1.5***		•

*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001

Список используемой литературы

1. пат. US 5,480,782
2. Пат. DE 4334600 A1
3. Пат. WO 81/03124
- 5 4. Ершов Ф.И., Антивирусные препараты, Москва, изд-во Медицина, 1998
5. Пат. US 6,337,093)
6. пат. RU 2172322
7. Chernysh et al. Antiviral and antitumor peptides from insects // PNAS, 2002, 99,
p. 12628-12632

10

15

20

25

30

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

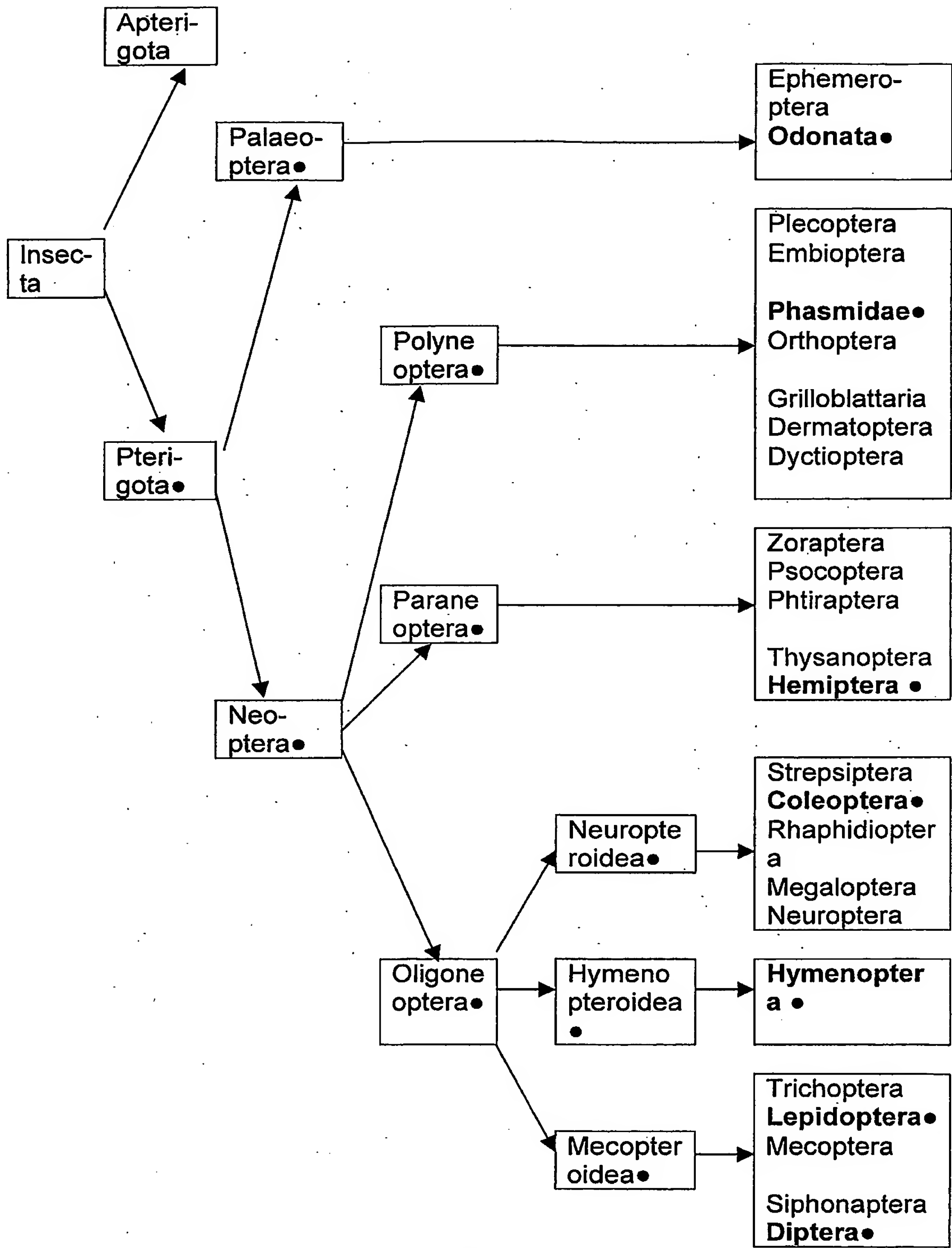
1. Антивирусный препарат, увеличивающий выживаемость клеток-хозяев при вирусной инфекции, отличающийся тем, что в качестве источника для получения антивирусного препарата используют насекомых подкласса Pterigota.
5
2. Антивирусный препарат по п. 1, отличающийся тем, что в качестве насекомых подкласса Pterigota используют виды отряда Odonata.
3. Антивирусный препарат по п. 2, отличающийся тем, что в качестве видов отряда Odonata используют виды семейства Aeschnidae
- 10 4. Антивирусный препарат по п. 3, отличающийся тем, что в качестве видов семейства Aeschnidae используют стрекоз рода *Aeschna*
5. Антивирусный препарат по п. 2, отличающийся тем, что в качестве видов отряда Odonata используют виды семейства Libellulidae
6. Антивирусный препарат по п. 5, отличающийся тем, что в качестве видов семейства Libellulidae используют стрекоз рода *Libellula*
15
7. Антивирусный препарат по п.1, отличающийся тем, что в качестве насекомых подкласса Pterigota используют виды отрядов Mantoptera, Hemiptera, Mecoptera, Hymenoptera
8. Антивирусный препарат по п.1, отличающийся тем, что в качестве насекомых подкласса Pterigota используют виды отряда Coleoptera.
20
9. Антивирусный препарат по п. 8, отличающийся тем, что в качестве видов отряда Coleoptera используют виды семейства Carabidae
10. Антивирусный препарат по п. 9, отличающийся тем, что в качестве видов семейства Carabidae используют жуков рода *Pseudophonus*
- 25 11. Антивирусный препарат по п.1, отличающийся тем, что в качестве насекомых подкласса Pterigota используют виды отряда Diptera
12. Антивирусный препарат по п. 11, отличающийся тем, что в качестве видов отряда Diptera используют виды семейства Stratiomyidae
13. Антивирусный препарат по п. 12, отличающийся тем, что в качестве видов семейства Stratiomyidae используют львинок рода *Stratiomys*
30
14. Антивирусный препарат по п.1, отличающийся тем, что в качестве насекомых подкласса Pterigota используют виды отряда Lepidoptera.
15. Антивирусный препарат по п. 14, отличающийся тем, что в качестве видов отряда Lepidoptera используют виды семейства Noctuidae

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)

16. Антивирусный препарат по п. 15, отличающийся тем, что в качестве видов семейства Noctuidae совок рода *Mamestra*
17. Антивирусный препарат по п. 15, отличающийся тем, что в качестве видов семейства Noctuidae совок рода *Diachrisia*
- 5 18. Антивирусный препарат по п. 14, отличающийся тем, что в качестве видов отряда Lepidoptera используют виды семейства Geometridae
19. Антивирусный препарат по п. 18, отличающийся тем, что в качестве видов семейства Geometridae используют пядениц рода *Operophtera*
- 10 20. Индивидуальные вещества из состава антивирусного препарата по п.п. 1-19, увеличивающие выживаемость клеток-хозяев при вирусной инфекции.
21. Аналоги индивидуальных веществ по п. 20, получаемые путем химического или биологического синтеза, и их производные, например, соли и амиды соответствующих белков и пептидов.
- 15 22. Фармацевтические композиции, включающие антивирусный препарат по пп. 1-19 или его индивидуальные компоненты по п. 20 или аналоги индивидуальных компонентов по п. 21.
23. Применение антивирусного препарата по пп. 1-19 или его индивидуальных компонентов по п. 20, или аналогов индивидуальных компонентов по п. 21 для разработки антивирусных лекарственных средств.
- 20 24. Применение антивирусного препарата по пп. 1-19 или его индивидуальных компонентов по п. 20, или аналогов индивидуальных компонентов по п. 21, или фармацевтических композиций по п. 22 для лечения и профилактики вирусных инфекций.

25

30



Фиг. 1